AMRESCO　Ready One-Step RT-PCR Kit（1B1326-50RXN, 1B1326-100RXN）
取扱説明書

本製品は RT-PCR 反応をたった 1 ステップで実現するキットです。RT-PCR に続くゲルローディングと RT-PCR 産物の検出は、ローディングバッファーとバンド確認のための蛍光色素が既に製品に含まれていることによって、簡略化されています。ユーザーはプライマーとテンプレート RNA を準備するだけです。

本製品は Ready One-Step 逆転写酵素と Ready One-Step RT-PCR Mix がそれぞれ1チューブずつに入っています。Ready One-Step 逆転写酵素は M-MLV と希少、または豊富な転写産物から cDNA 合成を行うための適切なバッファーが含まれています。Raedy One-Step RT-PCR Mix は反応バッファーと AMRESCO Extender Taq polymerase ブレンド、dNTPs、電気泳動トラッキング色素、非変異原性 EzVISION が含まれています。反応が終われば、PCR 反応産物は直接ゲルにローディングすることが出来、泳動中にトラッキング色素は赤でご覧いただけます。（1%ゲルで約 10bp の位置の目安です）電気泳動が終わると、ゲル染色や脱色をすることなく、標準的な UV イルミネーターでバンドを検出していただけます。

【内容量】

●1B1326-50RXN

・Ready One-Step Reverse Transcriptase　1本

・Ready One-Step RT-PCR Mix　1 本

●1B1326-100RXN

・Ready One-Step Reverse Transcriptase　1本

・Ready One-Step RT-PCR Mix　2 本

【保存温度】

-20℃保存

Ready One-Step RT-PCR Mix は凍結融解を 15 回繰り返し可能です

【使用方法】

1. Primer と DNase 処理済みテンプレート RNA、Ready One-Step RT-PCR Mix を氷上で溶解します。

2. 以下の表に従って核酸ミックス 24 uL を作成します

内容	容量(50 uL 反応) uL	終濃度
RNA サンプル	1-23	>1 ng
Forward Primer, 10uM	0.5	0.1 uM
Reverse Primer, 10 uM	0.5	0.1 uM
Nuclease-free 蒸留水	適宜	-

3. 核酸ミックスを 65℃で 5-10 分間熱変性させ、すぐに氷上に置きます。

4. 以下の表に従って One-Step RT-PCR 反応液を作成します。

内容	容量(50uL 反応)	終濃度
核酸ミックス	24	
Ready One-Step RT-PCR Mix	25	1×
Ready One-Steo Reverse Transcriptase	1	

*Note: DNA コンタミネーションのコントロールのためには Ready One-Steo Reverse Transcriptase を

入れない反応液として調製して下さい。

5. 逆転写と PCR 反応は以下のサイクルで行って下さい。

ステップ	時間(分)	温度(℃)
A	5:00	25
B	60:00	42
C	15:00	70
D	2:00	95
E	0:30	95
F	0:30	55-65
G	1:00*	68-72
E-G のステップを 29 回繰り返す		
H	7:00	68
I	HOLD	4

6. PCR 産物をアガロースゲルにロードし、5-8V/cm で泳動して下さい。PCR 産物は標準的な UV トランスイルミネーターで検出することができます。この蛍光はブルースペクトルを示します。

＊＊検出のコツ＊＊

露光時間を EtBr よりも 2~3 倍長くとって下さい。

【FAQs】

Q1　バンドが見えません

A1　DNase 処理済み RNA サンプルに DNase が混入していることが考えられます。

A1　RNase が混入している

A1　産物の収量が少なすぎて EzVISION で検出することが出来ないことが考えられます。EtBr を使って後染めして下さい。

Q2　サンプルがアガロースゲルのウェルから浮き上がってきます。

A2　反応は TAE バッファーを使用したアガロースゲルシステム用です。もしランニングバッファーが TAE バッファーよりも密度が高い場合、サンプルはウェルに落ちていきません

Q3　目的外の場所にバンドが見えます

A3　ことなる RNA と DNA の混入が考えられます

A3　ゲノム DNA 不完全な分解が考えられます

A3　複数の RNA ターゲットが共存していることが考えられます

A3　非特異的なプライマーのアニーリングが考えられます

A3　プライマーダイマーが出来ている可能性が考えられます

株式会社エムエステクノシステムズ

●大阪　電話 06-6396-6616

●東京　電話 03-3235-0673